

03 APR 11 PM 2:39

RECEIVED
TECH CENTER 1600/2900

#24
Linda
4/17/03

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of

Frederic KLEIN et al

Application No.: 09/155,982

Filed: October 9, 1998

For: MEANS FOR DETECTING BACTERIA OF
THE TAYLORELLA EQUIGENITALIS SPECIES
AND THEIR BIOLOGICAL APPLICATIONS

Group Art Unit: 1645

Examiner: V. Portner

Confirmation No.: 9420

DECLARATION

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

I, GRADINARU Dragos, hereby declare as
follows:

1. I am an inventor for the above-identified application.
2. My position is Head of veterinary diagnostic department of "Laboratoire
Départementale de l'Orne", France.
3. A copy of my Curriculum Vitae is attached hereto as Appendix A.
4. I have reviewed the Official Action dated October 11, 2002, as well as the
references cited therein.
5. I do not agree with the positions set forth in the Official Action.
6. Claim 1 of the patent application, as amended, defines the monoclonal
antibodies of the instant invention as being:

Isolated monoclonal antibodies or their Fv, Fab, and F(ab')² fragments, which recognize an epitope of a
bacterium of each of seven wild-type strains of the species *T. equigenitalis*, and which do not exhibit a
crossed reaction with *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*,

Streptococcus equi, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Actinobacillus equuli*.

7. The monoclonal antibodies are also defined as follows:

Isolated monoclonal antibodies, which can be obtained from hybridomas by a method comprising:
fusing non-secreting murine myeloma cells with spleen cells from mice immunized against an inactivated strain of the species *T. equigenitalis* or extract(s) of such a strain,
cloning and selecting according to the capacity of their culture supernatant to recognize an epitope or epitopes of a bacterium of each of seven wild-type strains of the species *T. equigenitalis*, and to not exhibit a crossed reaction with any of *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus equi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Actinobacillus equuli*,
recovering the required monoclonal antibodies, and
optionally purifying said monoclonal antibodies.

8. As set forth in the specification, such monoclonal antibodies are useful in kits for detecting the presence of a bacterium of the species *T. equigenitalis* in a specimen or culture.

9. I do not believe the cited prior art discloses or suggests a monoclonal antibody as instantly claimed.

10. Akuzawa et al fails to disclose a monoclonal antibody as claimed in the instant application.

11. The Akuzawa et al Abstract cited in the Official Action does not disclose or suggest a monoclonal antibody as instantly claimed. First, Akuzawa et al does not teach a monoclonal antibody which will recognize an epitope of a bacterium of each of seven wild-type strains of the species *T. equigenitalis*. Akuzawa et al does not teach a monoclonal antibody which will recognize "an epitope of a bacterium of each of the seven wild-type strains of the species *T. equigenitalis*." As stated in the Abstract, the monoclonal antibody of Akuzawa et al reacts with only "5 strains from 10 separate strains of wild *T. equigenitalis*." Table II of the application (Page 14) shows that the claimed monoclonal antibodies react with seven separate strains of wild *T. equigenitalis*.

12. Applicants' claims also recite that the claimed monoclonal antibodies "do not exhibit a crossed reaction with *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus equi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Actinobacillus equuli*." This is also shown in Table II of the application on page 14. A monoclonal antibody which does not exhibit a crossed reaction with each of these species is not shown in the reference. The reference states that the monoclonal antibody does not react with other equine uterine-infection causing bacteria, but does not disclose a monoclonal antibody that does not exhibit a crossed reaction with any of the specified bacteria. While the Abstract states that "the specificity of the monoclonal antibodies was investigated using 9 strains of bacteria other than *T. equigenitalis* (such as *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, and the like) derived from horse uteruses," each of the 9 strains tested are, however, not identified. Contrary to the assertion in the Official Action, that the monoclonal antibodies did not cross react with nine unidentified bacteria does not teach or suggest that the monoclonal antibodies did not cross react with the eight specified bacteria in the claims.

13. The monoclonal antibodies of Akuzawa et al cannot be used in a diagnostic kit as instantly claimed. As stated in the "Results" section, the monoclonal antibodies reacted with only 5 out of 10 strains of wild *T. equigenitalis*. Since Akuzawa et al's monoclonal antibodies react with only some strains of *T. equigenitalis*, they could not be used in a diagnostic kit, as instantly claimed. By

comparison, applicants' monoclonal antibodies reacted with all seven separate strains of wild *T. equigenitalis* against which they were tested.

14. In the rejection, only an Abstract of Friedrich is cited. The Results of this work by Friedrich are more completely described in his complete dissertation. These Results were previously submitted with Applicants' prior response.

15. On page 7 of the Official Action, last paragraph, it states that page 19 of the translation states: "In the study of potential cross-reactions of all the mAb used with representatives of different bacterial species, no antigenic affinities could be detected." The translation is also cited for the statement "[S]ince the mAb TF II8D4 and TF III 11B5 detect all the *Taylorella* strains under test with the ELISA technique, did not show any cross-reactions with previously tested bacterial species and these antibodies are able to react with the IFT technique, it is possible to establish a rapid test based on IFT."

16. The sentence which follows that quoted from page 19 states: "Potential antigenic affinity of *T. equigenitalis* with *Streptococcus zooepidemicus* and *Streptococcus equi* cannot be proven due to the non-specific fixation of the conjugate used represented in the figure (Fig. 19)."

17. The claims require that the monoclonal antibodies of the claims "not exhibit a crossed reaction with *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus equi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella*

multocida, *Pseudomonas aeruginosa* and *Actinobacillus equuli*." Since Friedrich's monoclonal antibodies may have a crossed reaction with at the very least *Streptococcus equi*, it fails to disclose or suggest applicants' invention. The translation of the dissertation does not show a monoclonal antibody which does "not exhibit a crossed reaction with *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus equi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Actinobacillus equuli*."

18. Friedrich does not teach a monoclonal antibody that does not exhibit a crossed reaction with any of the claimed species, much less one that does not exhibit a crossed reaction with each of them. In particular, *Streptococcus equi* is a very common bacteria in females. A monoclonal antibody which can distinguish between *T. equigenitalis* and *Streptococcus equi* would thus be very advantageous over the prior art, and would eliminate many false positives. Since the monoclonal antibody of Friedrich is disclosed as possibly exhibiting a crossed reaction with *Streptococcus equi*, Friedrich does not teach a monoclonal antibody that can make the distinction between *T. equigenitalis* and *Streptococcus equi*. Friedrich thus does not disclose a monoclonal antibody that can be used in a kit to detect a bacterium of the species *T. equigenitalis* in a specimen or in a culture. By contrast with Friedrich, the instantly claimed monoclonal antibodies will avoid false positives from other species, such as *Streptococcus equi*.

19. In the instant invention, the monoclonal antibodies were prepared and tested. They were tested using the various strains of *T. equigenitalis* and the strains of other bacteria commonly

found in females. As shown in Table II, the monoclonal antibodies of the invention do not cross react with the various other bacteria strains tested and do cross react with all of the bacteria cited, which are common in females.

20. Results relating to this invention were presented in an abstract and poster at the IXth International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians, on June 2-5, 1997, at College Station, Texas, USA. The Abstract is attached hereto as Appendix B. As shown therein, the monoclonal antibodies of the invention were used in an indirect immunofluorescence (IIF) test to evaluate their sensitivity and specificity. Several experiments were done.

21. In the first experiment, the claimed monoclonal antibodies detected 4 reference strains and 253 (97.7%) out of 259 field strains, as tested by French Reference Laboratory of Contagious Equine Metritis (CEM).

22. In the second experiment, five French State Veterinary Laboratories compared the results of 1014 routinely CEM swabs by three methods: IIF using the monoclonal antibodies of the invention, IIF using polyclonal antibodies, and culture. In this test, the culture was considered the reference test. Out of 1014 samples, only one *Taylorella equigenitalis* was isolated and identified in culture, but 58 (6%) were positive with the IIF-Mabs kit and 409 (40%) with the polyclonal IIF test.

23. This experiment shows a sensitivity of 97.7% and specificity of 94%, the indirect immunofluorescence test using monoclonal antibodies could be a valuable test for the diagnosis of contagious equine metritis.

24. These experiments show the beneficial and unexpected results achieved by the instant invention. It would not have been known, prior to the instant invention, that such sensitivity and specificity could be achieved.

25. As stated *supra*, Friedrich's monoclonal antibodies have not been shown to possess the characteristics of the monoclonal antibodies now claimed. Friedrich's monoclonal antibodies thus are not shown to be specific. They would, therefore, not be useful in a diagnostic kit as instantly claimed.

26. Friedrich has 2 MABs, TFII8D4 and TFIII11B5, as shown on page 18.

27. As shown in Table II of the invention, applicants' monoclonal antibodies have a specific pattern for cross reacting with other species and not being crossreactive with others.

28. Table III of Friedrich show's that the monoclonal antibodies of the claims detect activity. However, no activity was shown for Friedrich from the results using the immunoblot technique. An immunoblot is used in the art to show specificity of an antibody. To test an antibody for activity, if there is no reaction, then specificity is not known for the antibody.

29. For the reasons set forth *supra*, it is my opinion that Friedrich does not disclose or suggest a monoclonal antibody as claimed in the instant application.

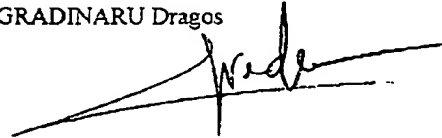
30. I further declare that I am aware that willful false statements and the like are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code, and my jeopardize the validity of any patent application or

any patent issuing thereon. All statements made of my own knowledge are true, and
all statements made on information and belief are believed to be true.

April 10, 2003

Date

Name: GRADINARU Dragos

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dragos', is written over a horizontal line. The signature is stylized with a long, sweeping horizontal stroke extending to the right.

Drag s GRADINARU

« Les Fraudières »

61250 Radon

Né le 17 février 1948

Situation de famille : marié, 1 enfant

DIPLOMES :

- baccalauréat : math - chimie (1966)
- diplômé de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Bucarest, Roumanie (1972)
- diplômé d'immunologie de l'Institut "Dr V.Babes", Roumanie (1976)
- diplômé de virologie de l'Institut de Virologie "Dr Stefan Nicolau", Roumanie (1977)
- diplômé de génétique moléculaire de l'Institut de Virologie "Dr Stefan Nicolau", Roumanie (1978)
- licence d'anglais scientifique (1982)
- licence d'allemand (1979)

STAGES / FORMATIONS EN FRANCE :

- Métrite contagieuse équine, CNEVA Alfort, 17-18 mai, 1993
- Virologie poissons, Unité d'Ichtiopathologie Continentale du CNEVA Alfort, 10-12 mai, 1994
- Dépistage sérologique de l'IBR, Laboratoire de Pathologie Bovine du CNEVA Lyon, 08 juin, 1995.
- Diagnostic des infections virales du porc, Unité de Recherches de Pathologie Porcine du CNEVALCRAP, - Ploufragan, France, 14-15 novembre, 1995
- Informatique : initiation, structure et programmation de "4D": création d'une base, manipulation des données, l'explorateur, les formulaires, saisie, états, organisation du stockage de l'information, tables champs, relations, l'explorateur & manipulation avancée des formulaires, programmation ; ACI, Clichy, 14-18 avril, 1997.
- Informatique : formation word ; CNFPT Basse Normandie, Hérouville Saint Clair, 28.05.1998 – 09.06.1998
- Informatique : formation excel ; CNFPT Basse Normandie, Hérouville Saint Clair, 28.05.1998 – 09.06.1998
- Statistiques appliquées au laboratoire ; CNFPT Basse Normandie, Hérouville Saint Clair, 15 – 19.06.1998
- Biosécurité en labo d'analyses, ISPAIA Ploufragan, 6 – 7.03.2000
- Biologie moléculaire « PCR meeting », Texas Veterinary Medical Diagnostic Laboratory System, College Station, Texas, USA, 2-5.06.1999
- Sérologie animale : exigences spécifiques du Programmen 109, CNFPT Provence-Alpes-Côte-d'Azour, 8 – 9. 03. 2000
- Prionics Check, test rapide de dépistage de l'ESB, AES, Combours, 27 – 28.12.2000
- Conduire et animer une réunion, CNFPT Basse Normandie, Hérouville Saint Clair, 08 – 10.10.2001
- Prionics Check LIA, test rapide de dépistage de l'ESB par chémiluminescence, formation assuré par Matthias Meier (Prionics) et François Vautard (AES) au LDO, 4 – 6. 05. 2002
- Bio-Rad, « Détection de l'encéphalite spongiforme bovine » par le test « Platelia », Marnes la Coquette, 17 et 18 décembre 2002

BREVETS D'INVENTION :

- "Technique de préparation et de purification de l'antigène glycoprotéique pour le diagnostic sérologique de la leucose enzootique bovine par le test d'immunodiffusion en gélose " : brevet d'invention n° 68768 du 09/09/1978 déposé le 08/12/1977 à l'OSIM (Bucarest)
- "Vaccin contre la leucose bovine et ovine " brevet d'invention n° 75100 du 13/08/1980 déposé le 13/03/1979 à l'OSIM (Bucarest)
- "Technique de préparation de l'antigène pour le diagnostic sérologique de l'anémie infectieuse équine par le test d'immunodiffusion en gélose " : brevet d'invention n° 82252 du 25/01/1982 déposé le 08/12/1977 à l'OSIM (Bucarest)
- "Vaccin contre la maladie de Carré " : brevet d'invention n° 86826 du 07/03/1985 déposé le 06/07/1983 à l'OSIM (Bucarest)
- "Moyens pour la détection de bactéries du genre *Taylorella* et applications biologiques" déposé le 12 avril 1996 à l'Institut National de la Propriété Industrielle (France) et en 1998 en Australie

PRIX :

Prix de l'Académie Des Sciences Roumaine pour l'article " Critère cytogénétiques pour l'identification des lignes cellulaires qui cultivent le virus de la leucose bovine publié dans "Archiva Veterinaria" vol. XVIII, p. 149-165 en 1987.

MEMBRE :

de la "Société de Médecine Vétérinaire Roumaine" depuis 1973
 de la "Société de Pathologie Cellulaire Roumaine" depuis 1980
 de la "Société de Pathologie Comparée Roumaine" depuis 1982
 de la "World association of Veterinary Laboratory Diagnosticians" depuis 1992
 de la "Société Française de Buiatrie" depuis 1992
 de la "European Association of Fish Pathologists" depuis 1993

LANGUES :

Anglais : courant
 Allemand : niveau moyen
 Roumain : langue maternelle

FONCTIONS :

- 1976-1980 vétérinaire à l'Institut Pasteur de Bucarest, Roumanie
- 1980-1982 chercheur à l'Institut Pasteur de Bucarest, Roumanie
- 1982-1989 chercheur principal III et adjoint du chef du laboratoire de virologie de l'Institut Pasteur de Bucarest, Roumanie (encadrement de 25 personnes)
- 1989-1990 chercheur principal II et chef du laboratoire d'immunologie de l'Institut Pasteur de Bucarest, Roumanie (encadrement de 50 personnes)
- 1990 (01 octobre) -1995 (8 septembre) responsable de service de virologie du Laboratoire Vétérinaire Départemental de l'Orne, Alençon, France ((encadrement de 2 personnes)
- 1995-1997 (9 février) : responsable des unités virologie, sérologie au Laboratoire Départemental de l'Orne (encadrement de 5 personnes)
- Depuis 9 février 1997 : responsable de service biologie vétérinaire : virologie, sérologie, bactériologie, autopsie, parasitologie au Laboratoire Départemental de l'Orne (encadrement de 9 personnes). Vétérinaire territorial titulaire depuis 21 novembre 1999 (après le concours réservé sur titre par le Conseil Général de l'Orne)
- Depuis 02 janvier 2001 : responsable de service biologie vétérinaire : virologie, sérologie, bactériologie, autopsie, parasitologie et l'unité ESB au Laboratoire Départemental de l'Orne (encadrement de 32 personnes).
- Depuis 01 janvier 2002 : responsable de service biologie vétérinaire : virologie, sérologie, bactériologie, autopsie, parasitologie, ESB et biologie moléculaire au Laboratoire Départemental de l'Orne (encadrement de 33 personnes).

ACTIVITES :**1) Recherches**

80 communications et publications scientifiques (voir la liste des références)

a) Domaines concernés :

- virologie et immunologie vétérinaire : responsable des programmes de recherches pour la leucose bovine enzootique, l'anémie infectieuse équine, la fièvre aphteuse, les anticorps monoclonaux.
- biotechnologies : culture de cellules, vaccins antiviraux, anticorps monoclonaux

b) Réalisations dans la recherche applicative :

- kit de détection de leucose bovine par immunodiffusion en gélose (commercialisé en Roumanie après autorisation ministériel n° 11678 de 1978)
- kit de détection de l'anémie infectieuse par immunodiffusion en gélose préparé avec un antigène obtenu par culture cellulaire (commercialisé en Roumanie après autorisation ministériel n° 177 de 1980)
- vaccin vivant contre la maladie de Carré (1974)
- test d'immunofluorescence indirecte pour détection des anticorps contre la leucose bovine
- technique d'isolement du virus de la leucose bovine en cultures cellulaires
- test de détection de la maladie de Carré par l'immunofluorescence directe
- quantification des particules 140 S du virus aphteux après ultracentrifugation en gradient de saccharose
- adaptation du virus de l'anémie infectieuse en cultures cellulaires
- détection des anticorps vaccinaux contre la fièvre aphteuse par le test ELISA
- adaptation du virus aphteux A5, O1, C à la souris
- caractérisation des souches de virus aphteux par SDS-PAGE
- purification d'un antigène du virus de leucose bovine pour la mise au point d'un test ELISA

- production d'anticorps monoclonaux contre une souche de virus aphteux C
- production d'anticorps monoclonaux contre l'IgG de porc
- isolement et identification d'une souche de virus syncytial respiratoire bovin
- production et caractérisation d'anticorps monoclonaux anti-*Taylorella equigenitalis*
- test d'immunofluorescence indirecte pour détection des anticorps contre *Neospora caninum*

c) Réalisations dans la recherche fondamentale :

- classification taxonomique du virus de l'anémie infectieuse équine
- étude de la transmission vertical du virus de la leucose bovine
- comparaison moléculaire des virus de la leucose bovine et du HIV

2) Production des vaccins et des réactifs biologiques

a) Production de vaccins :

- vaccin trivalent (IBR, BVD, PI3) vivant atténué
- vaccin bivalent (IBR, PI3) vivant atténué
- vaccin monovalent (BVD) vivant atténué
- vaccin anti-aphteux (A5, O1, C) inactivité trivalent, bivalent, monovalent en système industriel
- vaccin contre la maladie Carré

b) Production de Kits de diagnostic :

- kit pour le diagnostic de la leucose ézootique bovine par immunodiffusion en gélose (Roumanie)
- kit pour le diagnostic de l'anémie infectieuse équine par immunodiffusion en gélose (Roumanie)
- kit pour le diagnostic de la métrite contagieuse équine par immunofluorescence indirecte (en cours d'homologation par MAIA-DGAL, France)

3) Diagnostic

- 1980-1982 : responsable du diagnostic de la leucose bovine et anémie infectieuse équine (Institut Pasteur, Bucarest)
- 1982-1986 : coordinateur de l'équipe de diagnostic de la fièvre aphteuse et de la maladie vésiculeuse du porc (Institut Pasteur, Bucarest, 1982-1986)
- 1990-1995 : responsable du diagnostic des maladies virales bovines et poissons (LVD 61, Orne, France)
- 1995-1997 : responsable du diagnostic sérologique et virologique des animaux (LDO, Orne, France)
- Depuis 9 février 1997 : responsable du diagnostic de service biologie vétérinaire (LDO, Orne, France)
- Depuis 02 janvier 2001 : responsable de service biologie vétérinaire et de l'unité technique ESB (LDO, Orne, France)

4) Assurance qualité

Participation au Réseau Qualité National crée par DGAL pour l'accompagnement des laboratoires dans la démarche d'accréditation depuis 1993

Mise en place de l'assurance qualité des deux unités techniques du Service Biologie Vétérinaire LDO :

- Unité virologie, accrédité COFRAC le 16.03.2000 (Programme 112)
- Unité sérologie, accrédité COFRAC le 18.09.2001 (Programme 109)

Signataire des rapports d'analyses dans le cadre des programmes 109 et 112

Préparation de l'accréditation de l'unité ESB du LDO depuis mai 2001

Auditeur technique COFRAC pour le programme 167 : « Analyses de dépistage par tests rapides des encéphalopathies spongiformes transmissibles » (candidature acceptée par la Commission Technique d'Accréditation « Agro-Alimentaire » au cours de sa réunion du 25/04/2002)

Auditeur technique COFRAC pour le programme 109 : « Essais et analyses en immuno-sérologie animale » et le programme 112 : « Essais et analyses en virologie animale » (candidature acceptée par la Commission Technique d'Accréditation « Agro-Alimentaire » du 19/06/2002)

5) Informatique

- paramétrage du logiciel "TETRAED" et les tests pour mise en place de l'informatisation de service Biologie Vétérinaire du Laboratoire Départemental de l'Orne

6) Animation des réunions de formation pour les vétérinaires de l'Orne

La diarrhée virale bovine – maladie des muqueuses (BVD/MM)

La pneumonie produite par le virus respiratoire syncytial bovin (BRSV)

La rinotrachéite bovine infectieuse (IBR/IPV)

7) Formateur externe à l'Institut Supérieur de Formation (Damigny et L Mans)

Formateur du module : immunologie, virologie, techno vaccin pour les techniciens supérieurs en bio-industrie

TECHNIQUES MAITRISEES

- cultures cellulaires : cultures primaires (méthode classique et perfusion) et lignées cellulaires, systèmes industriels de culture (monocouche, rotation, suspension et microporteurs)
- production des vaccins viraux en système industriel
- tests sérologiques de diagnostic : séroneutralisation, immunofluorescence, ELISA, immunodiffusion en gélose, hémagglutination passive, réaction de fixation du complément, contérimunoélectrophorèse etc.
- tests virologiques de diagnostic : immunofluorescence, immunopéroxydase, immunoblotting, ELISA, réaction de fixation du complément.
- concentration des virus par ultrafiltration et précipitation
- purification et caractérisation du virus : ultracentrifugation en gradient (saccharose, CsCl), spectrophotométrie, densimétrie
- caractérisation des antigènes, anticorps et acides nucléiques viraux par SDS-PAGE
- chromatographie sur colonne de base et moyenne pression (d'exclusion stérique et d'affinité)
- technologie des anticorps monoclonaux : immunisation, fusion, sélection des hybridomes, clonage, identification des clones productrices, multiplication des hybridomes, purification et caractérisation des anticorps monoclonaux
- technique western blot pour la détection du Prp-res (diagnostic de l'ESB)

CONGRES INTERNATIONAUX

- Third Symposium in Cancer Immunotherapy, Bucarest, 1-2 Septembre 1977.
- Third Genetic Symposium, Piatra Neamt, 29-30 May 1981.
- 10th - Meeting of European Federation of Immunological Societies, England, Edinburgh, 10-22 September 1990.
- 6th International Symposium of World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Lyon, 9-11 Juin 1992.
- Journées Nationales de la Société Française de Buiatrie, avec participation internationale, Paris, 16-17 Décembre 1992.
- Congrès de la Société Française de Buiatrie "Dernières avancées sur les mécanismes, le diagnostic et le contrôle du complexe diarrhée virale bovine / maladies des muqueuses" Annecy, 4 décembre, 1992.
- Second Symposium on Ruminant Pestiviruses, Annecy, 1-3 octobre, 1992.
- Sixth International Conference "Disease of fish and Shellfish", Brest, France, 5-10 septembre, 1993.
- Congrès de la Société Française de Buiatrie "Infections à herpesvirus chez les bovins" Veyrier du Lac, 3 novembre, 1994.
- Congrès AVEF "Pathologie infectieuse du cheval" Lyon, 25-26 octobre, 1996.
- International Symposium "Salmonella and salmonellosis" Ploufragan, France, 20-22 mai, 1997.
- Congrès de la Société Française de Buiatrie "Troubles respiratoires des bovins" Paris, 26-27 novembre, 1997
- IXth International Symposium of World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, College Station, Texas, USA, 2-5 juin 1999-06-20
- International Symposium Aujeszky – PRRS, Ploufragan, France, 21-24 juin 1999
- Congrès Mondial des Vétérinaires, Lyon, France, 23-26 septembre 1999
- First international TSE diagnostic meeting, organisé par Bio-Rad, Paris, 08. 11. 2001
- Symposium, « Prionics – invent, create, innovate », Zurich, 14.06.2001
- Second international TSE diagnostic meeting, organisé par Bio-Rad, Paris, 14. 11. 2002

LOISIRS

- musique, dessin, badminton

The diagnosis of contagious equine metritis by indirect immunofluorescence test using monoclonal antibodies.

D.A. Gradinaru¹, F. Klein¹, E. Desmaris², M.N. Kérambellec³, Y. Portejoie³, B. Michel⁴, G. Lepage⁴, F. Marlhoux⁵, J. Vaissaire⁶, P. Pourquier⁷

ABSTRACT

(IX International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians, June 2-5, 199, College Station, Texas, USA)

For the diagnosis of contagious equine metritis by indirect immunofluorescence test (IIF), monoclonal antibodies (Mabs) were produced against *Taylorella equigenitalis* using two reference strains. Out of the 79 hybridoma clones shown to express antibodies to *T. equigenitalis* by IIF, 16 were selected and characterised. Four monoclonal antibodies which recognised the epitopes situated in proteins of 150, 120, 52.7 and 22 kDa were later used to prepare an IIF-Mabs kitTM (Pourquier Institute, Montpellier, France) for CEM field diagnosis.

This kit was tested in two experiments :

- firstly, by the French Reference Laboratory of CEM (C.N.E.V.A., Alfort) in order to identify 4 reference strains and 259 field strains which were isolated by the standard protocol used in the CEM controls in France : immunofluorescence using polyclonal antibodies and/or culture (isolation by bacteriological culture and identification by morphological and biochemical criteria).
- secondly, by five French State Veterinary Laboratories, which compared the results of 1,024 routine CEM swabs by three methods : Pourquier's IIF-Mabs kit, the IIF using polyclonal antibodies (C.N.E.V.A. Alfort) and the culture. In this experiment, the culture was considered the reference test.

Out of 259 field strains, 254 (97.7%) were recognised by the kit. The 6 strains which were negative by IIF-Mabs kit were not fully characterised, but they could belong to "Taylorella-like" strains.

In the second experiment, out of 1,024 samples, only one *Taylorella equigenitalis* was isolated and identified in culture, but 58 were positive with the IIF-Mabs kit and 409 with the polyclonal IIF test. This means that for routine diagnosis, the Pourquier IIF-Mabs kit significantly increases specificity up to 94% versus specificity of 60% with the polyclonal IIF test.

With sensitivity of 97.7% and specificity of 94%, the indirect immunofluorescence test using monoclonal antibodies (Pourquier's IIF-Mabs kit) could be a valuable test for the diagnosis of contagious equine metritis.

¹ Laboratoire Départemental de l'Orne - France -

² Laboratoire Départemental d'Analyses de l'Ain - France -

³ Laboratoire Vétérinaire Départemental du Maine-et-Loire - France

⁴ Laboratoire Vétérinaire Départemental de Mayenne - France

⁵ Laboratoire Vétérinaire Départemental de Seine-Maritime - France

⁶ C.N.E.V.A. - Laboratoire Central de Recherche Vétérinaire - Maisons-Alfort - France

⁷ Institut Pourquier - Montpellier - France

- (1) Laboratoire Départemental de l'Orne (LDO), 19-21 rue Candie, BP 7, 61001 Alençon cedex, France
- (2) Laboratoire Départemental d'Analyse de l'Ain (LDA 1), France
- (3) Laboratoire Vétérinaire Départemental du Maine-et-Loire (LVD 49), France
- (4) Laboratoire Vétérinaire Départemental de Mayenne (LVD 53), France
- (5) Laboratoire Vétérinaire Départemental de Seine Maritime (LVD 76), France
- (6) CNEVA-Laboratoire Central de Recherche Vétérinaire, Maison Alfort, France
- (7) Institut Pourquier, Montpellier, France